



UNIVERSITÀ DI PISA

MICROBIOLOGIA MOLECOLARE

EMILIA GHELARDI

Anno accademico
CdS

2022/23
BIOLOGIA MOLECOLARE E
CELLULARE
051FF
6

Moduli
MICROBIOLOGIA
MOLECOLARE

Settore/i
MED/07

Tipo
LEZIONI

Ore
48

Docente/i
MARIAGRAZIA DI LUCA
EMILIA GHELARDI

Obiettivi di apprendimento

Conoscenze

Il corso fornisce conoscenze avanzate in microbiologia e biologia molecolare necessarie per affrontare lo studio dei microrganismi in ambito biomedico, industriale e agrario.

Modalità di verifica delle conoscenze

Durante l'esame orale, lo studente dovrà essere capace di dimostrare la sua conoscenza del materiale del corso ed essere capace di discutere gli argomenti trattati appropriatamente e con proprietà di espressione.

Capacità

Acquisizione delle basi teoriche sull'organizzazione, la replicazione e l'evoluzione dei genomi microbici e delle metodologie applicabili alla generazione di ceppi ricombinanti, rilevamento di agenti infettanti ed analisi dei rapporti filogenetici, produzione di nuove molecole e vaccini ricombinanti. Il bagaglio culturale acquisito sarà sufficiente per attività *post-lauream* indirizzate verso una professione presso centri di ricerca.

Indicazioni metodologiche

Per garantire un buon apprendimento, è consigliata:

Presenza alle lezioni
Preparazione di un report orale
Partecipazione alle discussioni
Studio individuale
Studio di gruppo
Studio con supporto ICT

Programma (contenuti dell'insegnamento)

Scopo del corso è fornire le nozioni teorico-pratiche di metodologie molecolari microbiologiche. Verranno approfondite: (i) basi molecolari del trasferimento genico e generazione di ricombinanti; (ii) criteri di sistematica molecolare dei microrganismi ed analisi delle loro relazioni filogenetiche; (iii) sistemi molecolari innovativi per la rilevazione di batteri, virus e funghi da campioni biotici e non; (iv) Strategie per la produzione di farmaci antimicrobici e vaccini ricombinanti.

- Informazione genetica nei procarioti. Il mobiloma. Impacchettamento del genoma. Isole di patogenicità. Integroni batterici. Genomica comparativa.
- La mutazione genica. Tipi di mutanti. Base molecolare delle mutazioni. Mutageni chimici e fisici. IS e trasposoni. La mutagenesi per trasposizione. Mutagenesi con cassetta. Caratterizzazione di ceppi mutanti: analisi di stabilità, complementazione.
- I plasmidi. Tipi di plasmidi: funzioni. Replicazione plasmidica e funzioni dell'origine di replicazione. Controllo del numero di copie, specificità d'ospite, gruppi di incompatibilità. Partizione plasmidica. Storia dei vettori plasmidici. Seconda generazione di vettori plasmidici (serie pUC). Plasmidi zero background-TOPO. Plasmidi di espressione. Plasmidi reporter.
- Trasferimento genetico nei batteri. Meccanismi molecolari della coniugazione e trasduzione. La trasformazione naturale nei batteri. Induzione della competenza. Particolari su *B. subtilis* e *S. pneumoniae*. Meccanismi molecolari della trasformazione. Dettagli su *B. subtilis*, *S. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, *V. cholerae*. Trasformazione artificiale: meccanismi. Calcolo dell'efficienza di trasformazione.



UNIVERSITÀ DI PISA

- Preparazione di DNA plasmidico: crescita e lisi dei batteri, purificazione blanda. Purificazione accurata di plasmidi. Analisi qualitativa e quantitativa del DNA plasmidico.
- Metodi di elettroforesi del DNA. Elettroforesi su gel di agarosio, di poliacrilamide. Elettroforesi in campo pulsato: principi, apparati, metodologie applicate.
- Valutazione delle interazioni proteina-proteina in vivo ed in vitro.
- Ottimizzazione di una reazione di PCR. RT-PCR, multiplex PCR, nested PCR, RAPD-PCR, PCR quantitativa e realtime PCR.
- Metodi di sequenziamento e interpretazione dei risultati.
- Metodi di classificazione dei batteri. Microbiologia determinativa. Ibridazione DNA/DNA, sequenziamento di specifici geni. Il sistema MALDI-TOF MS per la classificazione e la tipizzazione batterica.
- Metodi di tipizzazione fenotipici: biotipizzazione, sierotipizzazione, tipizzazione fagica. Tipizzazioni tramite amplificazione, MLEE e MLST.
- Procedure diagnostiche: esami diretti ed indiretti. Le metodologie in microbiologia convenzionale. Campioni biologici particolari: liquor, sangue, urine e feci per la ricerca microbiologica.
- Chemioterapia antibiotica: introduzione e criteri di classificazione dei farmaci antibatterici. Antibiotici beta lattamici, glicopeptidi, aminoglicosidi, tetracicline, macrolidi, cloramfenicolo, chinoloni, rifamicine, polimixine, sulfamidici. Meccanismi molecolari dell'antibiotico-resistenza.
- Ruolo degli anticorpi nella risposta immune verso gli agenti infettanti. Risposta primaria e secondaria ad uno stimolo antigenico. Diagnosi sierologica. Concetto di titolo anticorpale. Reazioni di neutralizzazione, precipitazione e agglutinazione. Reazione di fissazione del complemento, EIA, immunofluorescenza, western blotting. Valutazione della risposta immune verso antigeni micobatterici.
- Metodi molecolari in microbiologia diagnostica. Sonde. Tecniche di amplificazione del target: PCR, TMA, SDA. Amplificazione delle molecole sonda: Qbeta replicasi, LCR. Metodi di amplificazione di segnale: branched DNA.
- Vaccini: caratteristiche e tipi. Vaccini convenzionali. Vaccini ricombinanti. Nuove generazioni di vaccini.
- Tecniche di microbiologia ambientale. Tecniche basate sulla coltivazione: arricchimento, coltivazione, identificazione. Tecniche basate sulla marcatura cellulare: colorazioni fluorescenti, live-dead, citofluorimetria. Tecniche di amplificazione per la valutazione della biodiversità microbica. Tecniche metagenomiche. Misurazioni delle attività microbiche nell'ambiente.

Modalità d'esame

Esame orale finale

Ultimo aggiornamento 06/09/2022 12:52